

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## Patent Abstracts of Japan

cited in the European Search  
Report of EP 95108977.0  
Your Ref.: H008-E01

PUBLICATION NUMBER : 03265814  
PUBLICATION DATE : 26-11-91

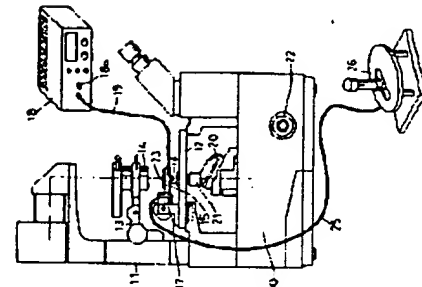
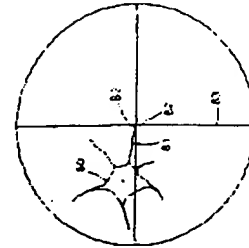
APPLICATION DATE : 16-03-90  
APPLICATION NUMBER : 02064018

APPLICANT : OLYMPUS OPTICAL CO LTD;

INVENTOR : ENDO ITARU;

INT.CL. : G02B 21/32 // A61K 48/00

TITLE : MICROSCOPE WITH ELECTRODE  
FOR HIGH VOLTAGE PULSE  
APPLICATION



**ABSTRACT :** PURPOSE: To observe the injection of an arriving material into a local part like the tip part of a neuron tip by providing an aligning mechanism for alignment adjustment in a plane perpendicular to the optical axis of an electrode holder, a moving mechanism which moves the electrode holder along the optical axis, and a power unit which generates high voltage pulses at an electrode.

CONSTITUTION: A metallic electrode 16 is moved down by moving the fine moving joy stick of a hydraulic operation part 26 slowly to focus on two black dots 82 indicating electrode tips, and also lowered clamping the neuron tip 81. Then the application switch 18a of the power until 18 is operated at the position where the joy stick abuts on a lower-limit stopper position to apply a voltage which is set previously and a high voltage pulse with pulse width to the periphery of the neuron tip 81. Consequently, the cell film is bored instantaneously and the arriving material which is dissolved in a culture solution is injected through the hole. Consequently, the injection of the arriving material can be observed through a microscope.

COPYRIGHT: (C) JPO

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>  
G 02 B 21/32  
// A 61 K 48/00

識別記号

庁内整理番号

7246-2K  
8615-4C

⑬公開 平成3年(1991)11月26日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全9頁)

⑭発明の名称 高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡

⑮特 願 平2-64018

⑯出 願 平2(1990)3月16日

⑰発明者 遠 藤 到 東京都渋谷区幡ヶ谷2-43-2 オリンパス光学工業株式会社内

⑱出 願 人 オリンパス光学工業株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

⑲代 理 人 弁理士 篠原 泰司 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡

## 2. 特許請求の範囲

標本とコンデンサーレンズとの間に絶縁された2本の電極を光軸に沿うように保持する電極ホルダと、前記電極ホルダの光軸に垂直な平面内での芯出し調整を行うための芯出し機構と、前記電極ホルダを光軸に沿って移動させる移動機構と、高電圧パルスを前記電極に発生させる電源装置とを備えて成る、高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、顕微鏡観察下において人や哺乳動物由来の培養細胞に外来の遺伝子や外来物質を注入するための高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡に関する。

〔従来の技術〕

外来遺伝子を培養細胞に注入し、その発現様式

からその遺伝子の構造と機能を対応付けようとする試みとして、従来から行なわれている注入方法にマイクロインジェクション法がある。このマイクロインジェクション装置を備えた顕微鏡の側面図を第1図に示す。この顕微鏡は、ステージ1に載置されていて内部に培養細胞2aが収納された培養容器2と、ステージ1の上方に設けられたコンデンサーレンズ3と、ステージ1の下方に設けられたレボルバー4に取付けられた対物レンズ5と、取付金具6を介してステージ1の下面に固定されていてそのマイクロビペット7aの先端が培養容器2内の培養細胞2aの近く即ち顕微鏡の焦点位置付近に延びているインジェクション装置7とを備えている。そして、これは、インジェクション装置7のマイクロビペット7aを降下させて培養容器2内の培養細胞2aを穿刺することで、培養液中に予め混ぜておいた外来遺伝子や酵素等の外来物質を注入させるブリッキングなる手技を行うように構成されている。又、このマイクロビペット7aの中に外来遺伝子をつめておいて培養

細胞 2 a 内に直接注入することもできるようになっていた。

他の従来技術として、培養細胞に高電圧パルスを加えて外来物質を取り込ませる方法がある。これはエレクトロポレーション (Electroporation) 法と呼ばれ例えば外来の遺伝子を取り込ませようとする時には、細胞と DNA の混合液を作り一定時間静置させることで DNA を細胞付近に吸着させた後、該混合液の入った容器に浸した一対の面状電極により高電圧パルスを加えることで細胞膜に瞬間的に穴を明けて吸着している DNA を細胞内に取り込むことができるものであった。

〔発明が解決しようとする課題〕

ところが、上記のマイクロインジェクション法で注入を試みようとする時、マイクロビペット 7 a を培養容器の底面に対して垂直に降下させて行き細胞 2 a を突き刺すことから、その降下操作に多大な神経を使うことになり、作業時の負担が多く、下げすぎによりマイクロビペット 7 a の先端で容器 2 の底面を突き該先端を破損させることが

多かった。又、第 1 2 図に示す如く、培養細胞 2 a の横断面を模式的に表わすと、核 2 a' とその周辺に若干の盛り上がりがある以外細胞質 2 a'' の部分は極めて薄く広がっているのが普通である。そして、培養細胞 2 a は弾力性に富むため、盛り上がり厚みのある核 2 a' 付近への穿刺はともかく、薄く広がる細胞質 2 a'' の部分への穿刺では細胞膜がマイクロビペット 7 a に押されてへこむだけで穴を明けることができず、困難を極めるという問題があった。更に、勢い余って細胞を突き破り、結局容器 2 の底面でマイクロビペット 7 a を破損させることが多かった。更に、近年は培養手技の発達と各種の細胞内注入法の普及により、その対象とされる培養細胞は神経細胞のようなごく薄く広がる細胞をはじめ、神経細胞から細く長く延びた神経突起の先端部というように局所化してきており、例えば神経突起の先端部に蛍光標識物質のインジェクションを行ない、蛍光標識物質が神経突起内でどのように拡散、輸送されるか観察したいという要望が増加している。

3

又、エレクトロポレーション法は、比較的大きな面電極を使用するため、インジェクションの前処理として両電極間に培養細胞を浮遊状態となるように処理しなければならず、その処理工程が煩雑であることや培養容器の底面にはり付いて成長する神経細胞のようなモノレイヤーには不向きであること、更に培養細胞の特定の局所部分を狙うインジェクションが不可能であるという欠点があった。

本発明は、上記の問題点に鑑み、従来困難とされていた神経細胞のようなごく薄い細胞やその神経突起の先端部のような局部分への外来物質のインジェクションを観察と同時に容易に行うことができ、作業効率の高い、高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡を提供することを目的としている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明による高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡は、標本とコンデンサーレンズとの間に絶縁された 2 本の電極を光軸に沿うように保持する電極ホルダと、前記電極ホルダの光軸に垂直な平

4

面内での芯出し調整を行うための芯出し機構と、前記電極ホルダを光軸に沿って移動させる移動機構と、高電圧パルスを前記電極に発生させる電源装置とを備えて成るものである。

〔作用〕

上記構成によれば、高電圧パルスインジェクション法 (エレクトロポレーション法) を顕微鏡観察下で容易に行うことができ、その結果従来困難とされていた神経細胞のようなごく薄い細胞やその神経突起のような細い部分への外来物質のインジェクションが顕微鏡観察下で可能となった。而も、その作業は容易で効率も高い。

〔実施例〕

以下、図示した実施例に基づき本発明を詳細に説明する。

第 1 図は本発明による高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡の一実施例の側面図であって、10 は顕微鏡本体、11 は照明系支柱、12 は顕微鏡本体 10 に固定されたステージ、13 はステージ 12 の上方にて照明系支柱 11 に取付けられた

コンデンサホルダ、14はコンデンサホルダ13に支持されたコンデンサーレンズ、15はステージ12とコンデンサーレンズ14との間に配置され且つ芯出し機構を備えている電極ホルダ、16は電極ホルダ15に垂下した状態で保持されているポイント電極の如く構成された一対の金属電極、17はステージ12の上面にネジ止め固定されていて電極ホルダ15を着脱自在に支持すると共に上下方向に駆動する例えば特公昭57-28122号公報に記載の如き油圧駆動部、18は顕微鏡本体10の外に配置されていて絶縁コード19を介して金属電極16の先端部に高電圧パルスを生じさせると共に該高電圧パルスの電圧、パルス幅を変化させ得る電源装置、20はステージ12の下方で顕微鏡本体1に上下動可能に装架されたレボルバー、21はレボルバー20に固定された対物レンズ、22はレボルバー20を上下動させてピント合わせを行う準焦ハンドル、23は培養細胞の入ったシャーレ、25は油圧駆動部17と油圧操作部26の間を接続する油圧伝達チューブ、

7

曲がっていて該基部で絶縁コード19が接続されていると共に内部に2本の絶縁されたコードが通され且つ該先端部で該2本のコードに2本の金属電極16が夫々接続されたし字型のホルダである。

第4図及び第5図は夫々油圧駆動部17の一部破断平面図及び縦断面図であって、37はステージ12の上面にネジ止め固定されていて縦方向のメスアリ37aを有している取付台、38は取付台37に貫通螺着されていて一端に溝を有する抜け防止用頭部38が形成され且つ他端にサラバネ39が嵌装されその後に粗動ハンドル40が螺着されたピニオン軸である。尚、ピニオン軸38を固定して粗動ハンドル40をねじ込む方向に回転させると、サラバネ39が圧縮されて大きな反発力が生じ、これを利用してピニオン軸38と粗動ハンドル40を一体的に動かす時の操作力を調整することができる。又、ピニオン軸38と粗動ハンドル40との間の摩擦力は、サラバネ39で生じる摩擦力により十分大きく設定してあるので、粗動ハンドル40のみがピニオン軸38に対して

26ば操作ハンドル26aの揺動操作により油圧駆動部17を駆動する例えば特開昭61-194417号公報に記載の如き油圧操作部である。

第2図及び第3図は夫々電極ホルダ15の一部破断平面図及び縦断面図であって、28はそのオスアリ28aが油圧駆動部17のメスアリに嵌合し且つクランプネジ29の締め付けにより該メスアリに固定される現状の支持枠、30は支持枠28内に光軸と直交する平面内で移動可能に挿入されていると共に支持枠28に螺合されたバネセット31、31及び芯出しツマミ32、32により中心に向かって押圧されていて芯出しツマミ32、32の進退により芯出しが行われる現状の芯出し枠、33は芯出し枠30に嵌挿されていて支持枠28を貫通し且つ芯出し枠30に螺着された固定ネジ34を締め込むことにより芯出し枠30に固定され、且つ緩めることにより芯出し枠30から離脱し得るようになる現状のホルダ枠、35は基部がホルダ枠33に水平状態で貫通保持され且つ先端部がホルダ枠33の中心において下方へ折れ

8

回転して緩むようなことはない。41はメスアリ37aと嵌合するオスアリ42を介して取付台37に上下動可能に支持され且つピニオン軸38と噛合するラック43を介して粗動ハンドル40により上下動せしめられるシリンダ、44はシリンダ41内を油室41aと空室41bとに区分するローリングダイヤフラム、45は一端がローリングダイヤフラム44に固定されたピストン杆、46はシリンダ41にローラガイド47を介して上下方向に移動可能に装架されていて下端がピストン杆45の他端と接続され且つ背部に電極ホルダ15の支持枠28のオスアリ28aと嵌合するメスアリ46aが形成されたスライド台である。

第6図は油圧操作部26の縦断面図であって、59は基台、60は支柱61を介して基台59上に固定されていて中央部に長溝60aが形成されたハンドレスト、62は基台59上に固定された筒状のフレーム、63はフレーム62の側壁に固定されたシリンダ、64はシリンダ63内を油室63aと空室63bに区分するローリングダイヤ

フレーム、65は一端がローリングダイヤフレーム64に固定されたピストン杆、66は基台59上に固定され且つ水平方向(第6図矢印A方向)に摺動可能であると共にピストン杆65の他端と接続されていて上部に頭部が球状のレバー66aを有しているスライダ、67はフレーム62の頂壁に上下方向に進退可能に螺着された支持棒、68は支持棒67に回動可能に支持されていて下部にレバー66aの頭部と嵌合する凹部68aが形成されたボール、69は下端がボール68の上部に固着されたシリンダ、70は下端がシリンダ69の上端に固着され且つ中途部が長溝60aにより矢印B方向に案内された微動ジョイスティックである。そして、ジョイスティック70の揺動によりボール68が回動してスライダ66が摺動せしめられるようになっている。71はシリンダ69内を油室69aと空室69bに区分するローリングダイヤフレーム、72は油室63a及び69aの間を接続する油圧伝達チューブ、73は下端がローリングダイヤフレーム71に固定されたピストン杆、74

はジョイスティック70の上端にジョイスティック70の中心軸の周り(第6図矢印C方向)に回転可能に装架されていると共に図示しないねじ軸を介してピストン杆73の上端と連結されていてその回転によりピストン杆73を軸方向に移動せしめる粗動ツマミである。尚、ハンドレスト60の長溝60aの両端縁がジョイスティック70の揺動範囲を決めるストッパとしての役割を果たしている。

次に本実施例を用いて高電圧パルスを印加して培養細胞に外来物質を注入する方法について説明する。

まず顕微鏡鏡体部Mの光学系を適切に調整した後、ステージ12上に載置されたシャーレ23の中の培養細胞に対し準焦ハンドル22によりピント合わせ作業を行う。次に、油圧駆動部17の粗動ハンドル40を操作して電極ホルダ15をシャーレ23に向って下降させる。オスアリ42がステージ12の上面に突き当たった所で電極ホルダ15の金属電極16の先端が培養細胞の略上方に到達したことになる。更に、油圧操作部26の粗

## 11

動ツマミ74を併用して電極ホルダ15を下降させ、金属電極16の先端をピント位置のわずかな上方に持ってくる。この時4×~10×の対物レンズ21を用いるが、第7図に示す如く、金属電極16の先端が視野の中で2つの黒い点82、82となって現われてくる。ここで芯出しツミマ32、32を進退させて芯出し棒30の位置調整を行うことにより金属電極16を視野の中心に持ってくる。さらには、接眼レンズのクロス目盛83等に合わせて正確な中心出しができればなお良い。最後に、油圧操作部26の微動ジョイスティック70をゆっくりと揺動操作して下限ストッパ位置まで倒し、その状態のまま粗動ツマミ74を回転させて、金属電極16を下降させ、その先端を培養細胞(神経細胞80)のピント位置に一致させれば全体のセッティングが完了する。

次に、培養細胞に対する高電圧パルス法によるインジェクションを行う。微動ジョイスティック70を揺動操作すると、ピントを合わせた位置を下限として100~500μmの金属電極16の上

## 12

下動が可能である。第7図に示すように顕微鏡の視野内においてインジェクションしようとする神経細胞80の神経突起81を視野の中心にくるようにし、微動ジョイスティック70をゆっくり移動させて金属電極16を降下させ、電極先端を示す二つの黒い点82、82に徐々にピントが合うようにすると共に神経突起81を挟み込むよう降下させてくる。そして、微動ジョイスティック70が下限ストッパ位置に突き当たった位置で電源装置18の印加スイッチ18aを操作して、予め設定された電圧とパルス幅の高電圧パルスを神経突起81の近傍に加える。尚、加えられる電圧は持続時間10~200μs、電解強度0.5~2kV/cm程度で、細胞の種類により最適値は異なる。加えられたパルス電圧により細胞膜に瞬間的に穴があき、そこから培養液中に溶かされていた外来物質が取り込まれることになる。その後、細胞膜は速やかに修復されるものと考えられている。外来物質として蛍光色素を使うと、この取り込まれた蛍光色素が神経突起81内を拡散、輸送される様

子がインジェクション直後から連続的に顕微鏡観察できる。

第8図は位相差観察を行う時の構成を示し、コンデンサーレンズ14の内部にはリングスリット14aが配置され、対物レンズ21の内部には位相板21aが含まれている。リングスリット14aと位相板21aは光学的に共役な関係にある。公知のこの位相差光学系は、コンデンサーレンズ14から試料に向かってリング状に集光するよう照明され、その光軸付近の光束は使われない。

第8図においてその電極ホルダ15の金属電極16はその光軸に沿って配置されているので、位相差観察における位相差効果を損なうことなく神経突起のような透明物体を観察することができる。

第9図は金属電極16の先端距離をインジェクションを行う細胞の大きさに合わせて変えるための構造を示している。36は電極チューブであって、これは絶縁性の材料から成り、2本の金属電極16、16を通すための2本の孔が僅かな傾きをもってあけられている。従って、電極チューブ

15

μの解明等に利用が期待される。

又、高電圧印加用電極は顕微鏡と一体的に構成されているから、インジェクションの直後からその後の経過を連続的に顕微鏡観察できるようになった。

又、金属電極の上下動操作により培養細胞に対する連続的な高電圧パルスインジェクションが可能となり、その結果従来から行われているマイクロピペットによるブリッキング法と同等以上の作動効率を上げることができる。

又、金属電極を照明光軸に沿うように配置したから、位相差観察下でもその位相差効果を損なうことがない。

又、金属電極の先端間隔を可変にした構造を備えているので、大きさの異なる培養細胞に最適なセッティングを行うことができる。

更に、金属電極の先端部を湾曲部に形成しているので培養容器の底に傷を付けたりして観察しにくくなることが防止できると共に、電極を下げすぎた時でも電極の曲がり防止することができる。

36の上下動により2本の金属電極16の先端間隔をAからA'の間で変えることができ、対象細胞の大きさに合わせて適切な電極間隔を設定することができる。

第11図は金属電極16の先端部に湾曲部16aに形成することでインジェクション時のシャーレ23の底との衝突によるシャーレ23の傷付きや電極16の曲がり防止し得るようにしたものを示している。

〔発明の効果〕

上述の如く、本発明による高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡によれば、高電圧パルスインジェクション法（エレクトロポーレーション法）を顕微鏡観察下で容易に行うことができ、その結果従来困難とされていた神経細胞のようなごく薄い細胞やその神経突起のような細い部分への外来物質のインジェクションが可能となった。そして、神経突起へのインジェクションが可能となったことにより、現在原因解明と治療薬の開発に全力が注がれているアルツハイマー型痴呆症のメカニズ

16

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明による高電圧パルス印加用電極を備えた顕微鏡の一実施例の側面図、第2図及び第3図は夫々上記実施例の電極ホルダの一部破断平面図及び縦断面図、第4図及び第5図は夫々上記実施例の油圧駆動部の一部破断平面図及び縦断面図、第6図は上記実施例の油圧操作部の縦断面図、第7図は上記実施例における観察視野を示す図、第8図は上記実施例において位相差観察を行う時の構成を示す縦断面図、第9図は上記実施例の電極部の構成を示す縦断面図、第10図は上記実施例の電極の変形例の構成を示す斜視図、第11図は従来例の一部破断側面図、第12図は培養細胞の横断面を模式的に示す図である。

10……顕微鏡本体、11……照明系支柱、12……ステージ、13……コンデンサホルダ、14……コンデンサーレンズ、15……電極ホルダ、16……金属電極、17……油圧駆動部、18……電源装置、19……絶縁コード、20……レポルバー、21……対物レンズ、22……集光ハン

17

18

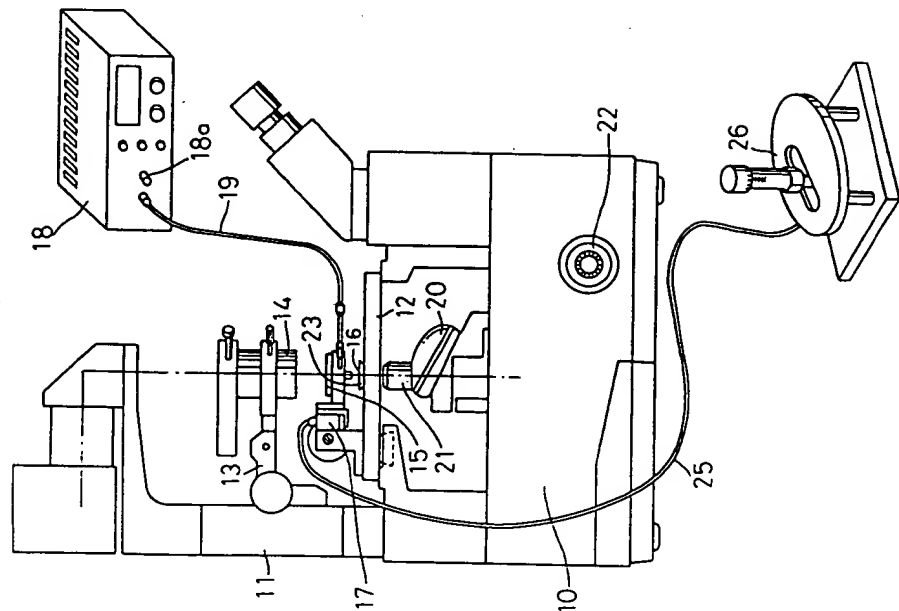
ドル、23……シャーレ、25、72……油圧伝達チューブ、26……油圧操作部、28……支持枠、29……クランプネジ、30……芯出し枠、31……バネセット、32……芯出しツマミ、33……ホルダ枠、34……固定ネジ、35……ホルダ、36……電極チューブ、37……取付台、38……ピニオン軸、39……サラバネ、40……粗動ハンドル、41、63、69……シリンダ、42……オスアリ、43……ラック、44、64、71……ローリングダイヤフラム、45、65、73……ピストン杆、46……スライド台、47……ローラガイド、59……基台、60……ハンドレスト、61……支柱、62……フレーム、66……スライダ、67……支持枠、68……ボール、70……微動ジョイステック、72……粗動ツマミ、80……神経細胞、81……神経突起、82……黒い点。

代理人 篠原 泰司  
代理人 鈴木 三義



19

図 1





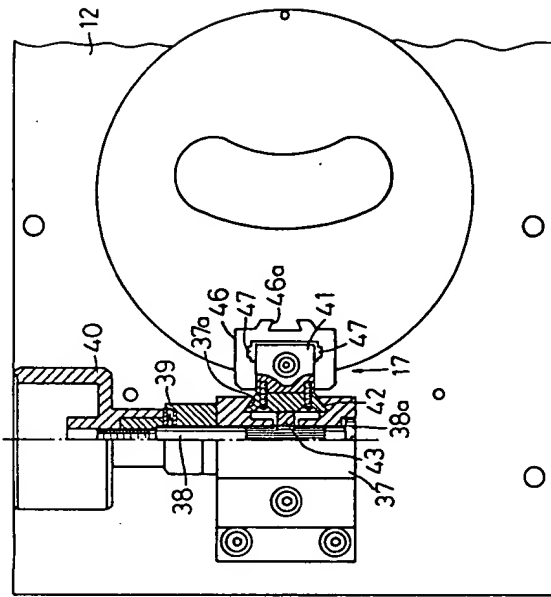


図 4

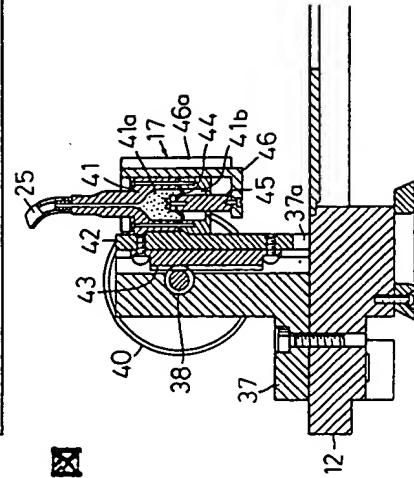


図 5

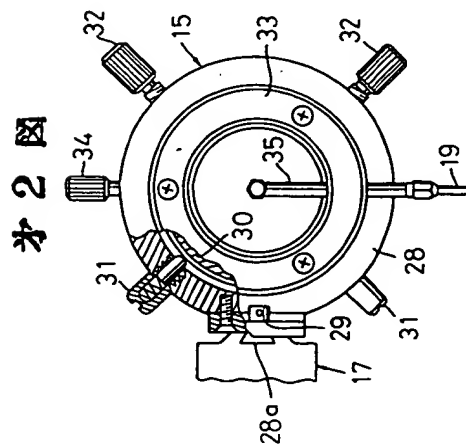


図 2

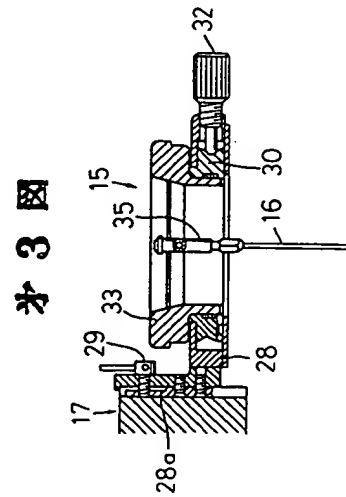


図 3

図 6

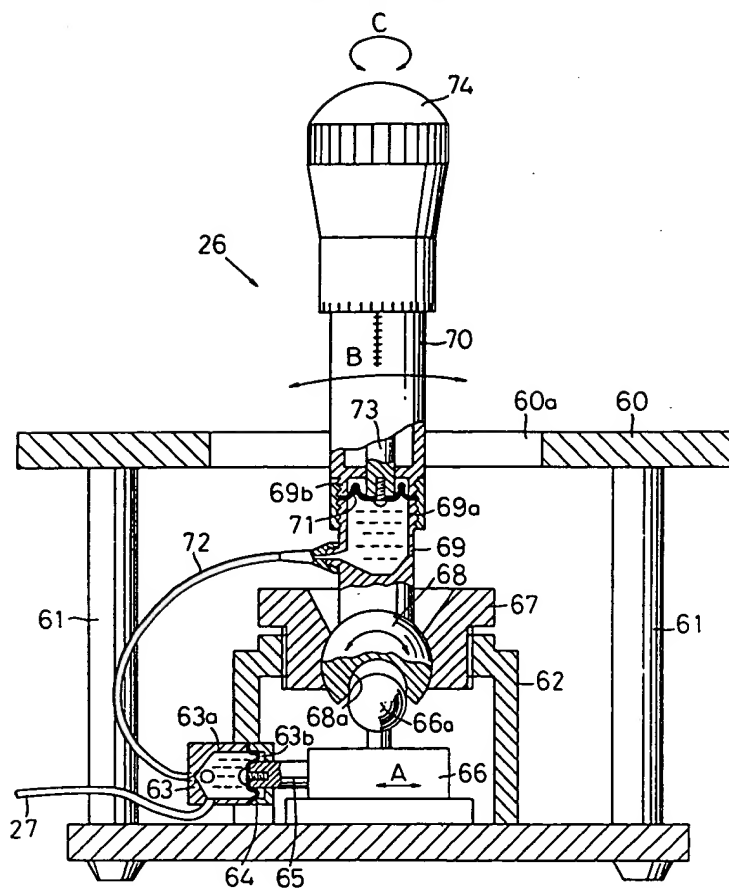


図 7

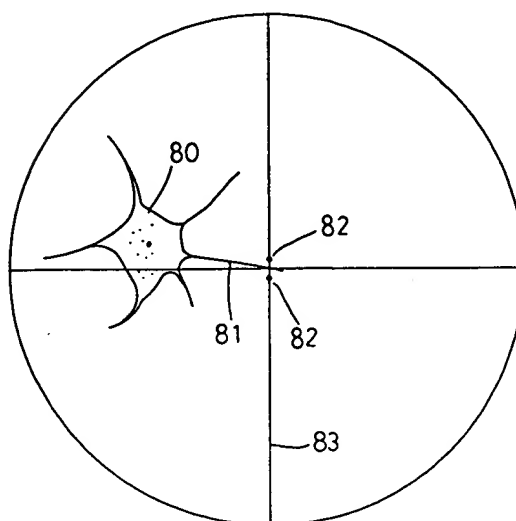


図 8

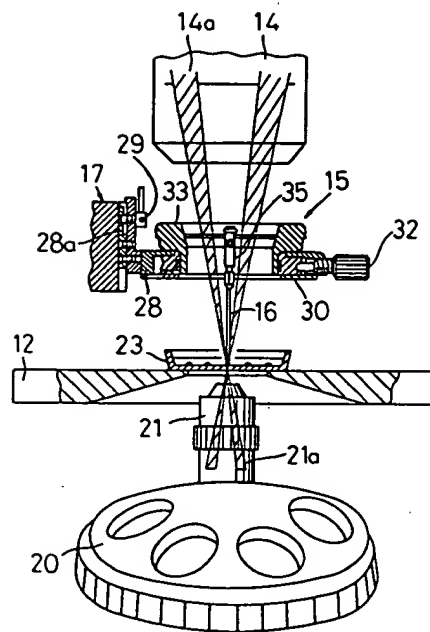


図 9

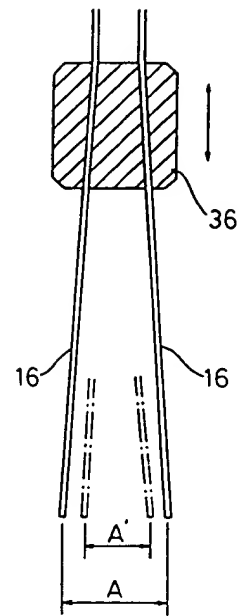


図 10

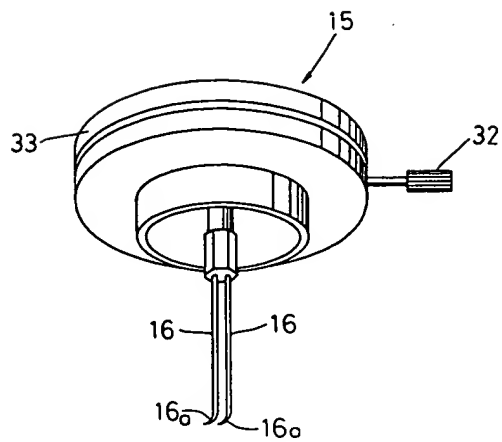


図 11

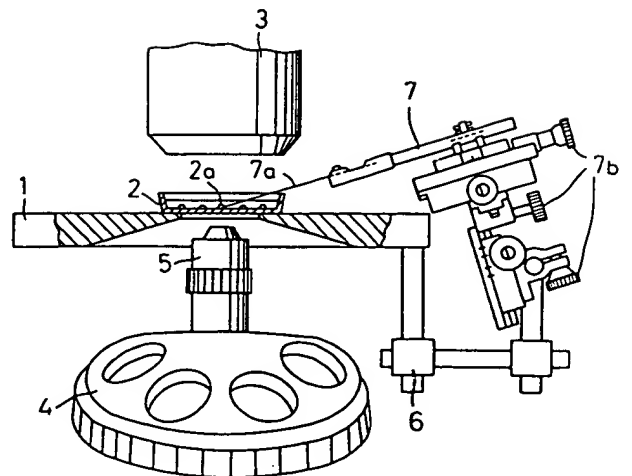


図 12

